

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Juli 2003 (03.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/054225 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**, (74) Anwalt: **TEIPEL, Susanne**; Schwabe, Sandmair, Marx,
B01J 19/00 Stuntzstrasse 16, 81677 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/13860

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Dezember 2002 (06.12.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 63 599.0 21. Dezember 2001 (21.12.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MICRONAS GMBH** [DE/DE]; Hans-Bunte-Strasse
19, 79108 Freiburg i.Br. (DE). **BIOCHIP TECHNOLO-
GIES GMBH** [DE/DE]; Engesserstrasse 4b, 79108
Freiburg i. Br. (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KLAPPROTH, Hol-
ger** [DE/DE]; Kehlerstrasse 12, 79108 Freiburg i. Br.
(DE). **LEHMANN, Mirko** [DE/DE]; Runzstrasse 71,
79102 Freiburg i. Br. (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING NUCLEIC ACID ANALYTES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREANALYTEN

(57) Abstract: The invention generally relates to a method and a device for determining nucleic acid analytes. The invention es-
pecially relates to the detection of the presence of one such analyte without the conventional use of optically detectable marker
substances.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Bestimmung von
Nukleinsäureanalyten. Insbesondere betrifft die Erfindung den Nachweis des Vorhandenseins eines solchen Analyten ohne die her-
kömmliche Nutzung von optisch nachweisbaren Markersubstanzen.

WO 03/054225 A2

Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäureanalyten

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Bestimmung von Nukleinsäureanalyten. Insbesondere betrifft die Erfindung den Nachweis des Vorhandenseins eines solchen Analyten ohne die herkömmliche Nutzung von optisch nachweisbaren Markersubstanzen.

Zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung von bestimmten Nukleinsäureanalyten wie z.B. DNA ist die Verwendung von im wesentlichen planaren Systemen bekannt, welche in der Fachwelt als Biosensoren bzw. Biochips bezeichnet werden. Diese Biochips bilden einen Träger, auf dessen Oberfläche i.d.R. eine Vielzahl von zumeist rasterartig angeordneten Detektionsbereichen ausgebildet ist, wobei sich die einzelnen Bereiche bzw. Bereichsgruppen jeweils durch ihre Spezifität gegenüber einem bestimmten nachzuweisenden Analyten voneinander unterscheiden. Im Falle der Bestimmung von DNA-Analyten befinden sich innerhalb der einzelnen Bereiche der Trägeroberfläche - direkt oder indirekt immobilisiert - spezifische Nukleinsäuresonden wie z.B. Oligonukleotide oder cDNA in zumeist einzelsträngiger Form, deren jeweilige Spezifität gegenüber der zu bestimmenden Nukleinsäure im wesentlichen durch die Sequenzabfolge (Sondendesign) vorgegeben ist. Die auf diese Weise funktionalisierte Chipoberfläche wird im Rahmen eines entsprechenden Nachweisverfahrens mit den zu bestimmenden DNA-Analyten unter Bedingungen in Kontakt gebracht, welche im Falle des Vorhandenseins der zuvor nachweisbar markierten Zielnukleinsäure(n) deren Hybridisierung mit den immobilisierten Sondenmolekülen gewährleisten. Die qualitative und ggf. quantitative Detektion eines bzw. mehrerer spezifisch gebildeter Hybridisierungskomplexe erfolgt anschließend zumeist durch

optophysikalische Lumineszenzmessung und Zuordnung der erhaltenen Daten zu den jeweiligen Detektionsbereichen, wodurch die Bestimmung z.B. der Anwesenheit oder der Sequenz des bzw. der Nukleinsäureanalyten und ggf. deren Quantifizierung ermöglicht wird.

Neben diesen lumineszenzgestützten Verfahren wurden in den letzten Jahren Anstrengungen unternommen, um DNA-Analytik ohne das Erfordernis der Verwendung von Lumineszenzmarkern und ohne die dafür erforderlichen Detektions- und Abbildungsmittel durchzuführen.

So wurde beispielsweise versucht, zwischen den möglichen Zustandsformen eines Einzelstranges und eines Doppelstranges mit Hilfe von Feldeffektransistoren (E. Souteyrand et al., Direct detection of the hybridisation of synthetic homooligomer DNA sequences by field effect, J. Phys. Chem. B., 1001, 2980, 1997) oder mit Impedanzstrukturen zu unterscheiden (s. z.B. P. Van Gerwen et al., Nanoscaled interdigital electrode arrays for biochemical sensors, Sensors and Actuators, B 49, 73-80, 1998).

Ein weiterer Ansatz des Standes der Technik betrifft die Nutzbarmachung der enzymatischen Aktivität der extrazellulären Endonuklease von *Serratia marcescens*, wobei der enzymvermittelte Abbau von DNA zu einer Veränderung des pH-Wertes führt, welche dann mit einem pH-Sensor gemessen werden kann (S. Reher, DNA-, RNA-Analytik mit voltametrischen, potentiometrischen und optischen Methoden unter Einsatz der extrazellulären Endonuklease *Serratia marcescens*, ISBN 3-89825-030-X, 1999).

Des weiteren existieren Veröffentlichungen, in denen die Durchführung der DNA-Analytik unter Verwendung bestimmter Markersubstanzen beschrieben wird, wobei die Detektion aber nicht über optische Methoden erfolgt. Der eine Ansatz betrifft die Markierung hybridisierter DNA mittels eines elektronischen Labels und dessen Haftung an eine Edelmetallelektrode, wobei dieses Bindungsereignis mit einer Elektrode ausgelesen wird. (www.microsensor.com/TechnologySystem.html, Clinical micro sensors ,2000). Die andere Arbeit beschreibt die Kopplung eines kleinen paramagnetischen Körpers an ein DNA-Molekül, wobei das Auslesen über die Veränderung des Magnetfeldes erfolgt (D.R. Baselt et al., A biosensor based on magnetoresistance technology, Biosensors & Bioelectronics 1998, 13(7-8):731-9, 1998).

Obwohl die vorgenannten Arbeiten Alternativen zur lumineszenzgestützten Nukleinsäureanalytik aufzeigen, leiden sie aufgrund der häufig über mehrere Stunden andauernden Hybridisierungsreaktion in Verbindung mit den zur Detektion eingesetzten Sensoren an einer Messabweichung, die in der Fachwelt als Drift bezeichnet wird. Diese Drift führt zu einem zeitlich veränderten Signal, welches häufig nicht vom eigentlichen Signal unterschieden oder ausreichend abgegrenzt werden kann, da sich letzteres in der selben Frequenzgrößenordnung wie die Drift befindet. Darüber hinaus ist es generell einfacher ein Signal auszulesen, das innerhalb einer möglichst kurzen Zeitdauer seine Signalthöhe erreicht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens, bei dem die mit der Drift-Problematik verbundenen Nachteile überwunden werden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren gemäß Hauptanspruch gelöst.

Nach einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung eines Nukleinsäureanalyten durch Hybridisierung des Analyten an eine geeignete, auf einer festen Phase immobilisierte Nukleinsäuresonde, bei dem man

(a) den Nukleinsäureanalyten zur Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen mit der Nukleinsäuresonde inkubiert, und

(b) den Analyten bestimmt auf der Basis physikalischer Messdaten, die spezifisch mit einer enzymbedingten Massenzu- oder abnahme des Hybridisierungskomplexes im Zusammenhang stehen,

wobei die Messung der Daten durch mindestens einen Sensor erfolgt, welcher integraler Bestandteil der festen Phase ist.

Durch diesen indirekten Lösungsansatz gelingt es erfindungsgemäß, die Detektion unter weitgehender Vermeidung der Drift-Problematik in ein anderes Zeitfenster und damit in eine andere Frequenz zu überführen, welches vorzugsweise nur wenige Sekunden oder Minuten umfasst (s. Fig. 1).

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Verfahrens sind in den Unteransprüchen dargestellt.

Der vorliegend verwendete Begriff „Bestimmung“ bezieht sich auf jedwede Analysierung einer Nukleinsäure und umfasst insbesondere den Nachweis des Vorhandenseins eines Nukleinsäureanalyten in einer zu untersuchenden Probe. Umfasst sind ferner Anwendungsformen wie die Ermittlung einer Nukleinsäuresequenz und die Erfassung von Mutationen wie insbesondere SNP's. Das vorliegende Verfahren gewährleistet

somit eine sehr große Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten, da es auf alle derzeit und zukünftig verfügbaren Bestimmungs- bzw. Nachweistechiken anwendbar ist, die auf der Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes beruhen.

5

Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird das die Massenzu- oder abnahme des Hybridisierungskomplexes bewirkende Enzym aus der Gruppe ausgewählt bestehend aus Polymerasen, Ligasen, Ribozymen, quasi-katalytischen Nukleinsäuren, DNasen/RNasen (Exo- bzw. Endonukleasen einschließlich Restriktionsendonukleasen), und RNase H, wobei eine Polymerase, insbesondere eine Polymerase mit einer 5'- und/oder 3'-Exonukleaseaktivität, besonders bevorzugt ist.

15 Neben den DNA-abhängigen DNA-Polymerasen kann eine Massenzunahme in Abhängigkeit der gegebenen Beschaffenheit der Nukleinsäure (RNA oder DNA) erfindungsgemäß auch durch Verwendung von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (reverse Transkriptase) bzw. RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Replikasen) erfolgen. Eine Massenzunahme kann ferner durch
20 den Einsatz von entsprechenden polymeraseaktiven Ribozymen bzw. quasi-katalytischen RNAs bewirkt werden. Für alle Polymerasen (einschließlich Ribozyme bzw. quasi-katalytische RNA's) gilt erfindungsgemäß, dass sowohl thermostabile wie
25 auch thermolabile Enzyme eingesetzt werden können.

Eine enzymatisch bewirkte Massenzunahme kann auch mittels Ligasen erfolgen. In diesem Zusammenhang wird auch auf die erfindungsgemäß geeignete Verwendung von ligaseaktiven
30 Ribozymen bzw. quasi-katalytischen RNA's hingewiesen. Für alle Ligasen (einschließlich Ribozyme bzw. quasi-katalytische RNA's) gilt, dass erfindungsgemäß sowohl thermostabile wie auch thermolabile Enzyme eingesetzt werden können.

Im Gegensatz zum Massezuwachs kann auch eine Masseabnahme detektiert werden. Eine Masseabnahme durch Spaltung der gebundenen Nukleinsäuren kann durch Nukleasen (RNasen, DNasen) erfolgen. Sowohl 5'- und/oder 3'- Exo- als auch Endonukleasen sowie Rnase H können Verwendung finden. Einzel- wie auch doppelstrangabhängige Enzyme bzw. Enzyme mit beiden Aktivitäten können eingesetzt werden. Für die Nukleasen gilt zudem, dass sequenzspezifische wie auch nicht sequenzspezifische Enzyme eingesetzt werden können. Auch Ribozyme bzw. quasi-katalytische RNA's mit Nukleaseaktivität sind geeignet. Ribozyme bzw. quasi-katalytische RNA's agieren i.d.R. sequenzspezifisch, wobei die Spezifität mittels der jeweiligen Hybridisierungssequenz entsprechend den Bedürfnissen eingestellt werden kann.

Die vorliegende Erfindung reflektiert demgemäß die bei den meisten Festphasen-gebundenen Nukleinsäureanalysen anzutreffende Situation des Vorliegens einer an einer festen Phase immobilisierten einzelsträngigen Nukleinsäuresonde (s. Fig. 1A). Unter geeigneten Bedingungen bildet sich an dieser Sonde im Falle des Vorhandenseins eines zu der Sondensequenz im wesentlichen komplementären Nukleinsäureanalyten ein zumindest teilweise mindestens doppelsträngiger Hybridisierungskomplex aus (s. Fig. 1B).

Erfindungsgemäß erfolgt im Anschluss an die Ausbildung des Komplexes die Einleitung eines enzymatischen Schrittes (s. Fig. 1C), wobei die Enzymleistung zu einer messbaren Veränderung der Masse dieses Komplexes führt.

Beispielsweise kann im Falle des Vorliegens eines aus einer kürzeren DNA-Sonde und eines im Vergleich dazu längeren Nukleinsäureanalyten bestehenden Hybridisierungskomplexes eine

Polymerase eingesetzt werden, welche unter geeigneten Bedingungen und in Anwesenheit der vier Nukleotidtriphosphate (A; T; G; C) in der Lage ist, den durch die längere Analyten-nukleinsäure bedingten einzelsträngigen Bereich - zumindest
5 teilweise - aufzufüllen (s. Figuren 1C und 1D). Bei einer unterstellten durchschnittlichen Bindungsgeschwindigkeit, die in einer Größenordnung von tausend Basen pro Minute liegt, erfolgt diese kontinuierliche Polymerisation innerhalb von wenigen Minuten. Dieses Beispiel geht von einer
10 unterschiedlichen Länge der beteiligten Hybridisierungspartner aus und ist auch auf den umgekehrten Fall anwendbar, bei dem der Analyt im Vergleich zur Sonde eine kürzere Kettenlänge aufweist. In diesem Falle kann es vorteilhaft sein, das Sonden-
design so zu gestalten, dass die Sonde eine Länge von
15 mindestens 100 Nukleotiden aufweist und der zu erwartende und mittels Polymeraseaktivität aufzufüllende einzelsträngige Bereich des Hybridisierungskomplexes möglichst dicht an die Sensoroberfläche heranreicht. Dieser Vorteil lässt sich auch erreichen, wenn die Sonde mit ihrem 3'-Ende immobilisiert wird
20 und die Auffüllung des einzelsträngigen Bereichs in Richtung fester Phase erfolgt. Diese vorteilhaften Ausführungsformen sind nicht nur auf Polymerasen sondern allgemein auf alle erfindungsgemäß geeigneten Enzyme übertragbar und können vom Fachmann in Abhängigkeit des gewünschten Anwendungsbereiches
25 leicht vollzogen werden.

Sofern in der zu analysierenden Probe kein zur Sondensequenz komplementärer Analyt vorhanden ist, so kommt es an dieser Stelle aufgrund unterschiedlicher Bindungsenergien zu keiner
30 Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes, weshalb die anschließende Enzymreaktion unterbleibt und keine enzymbedingten Messdaten erfasst werden können.

Da eine Hybridisierung ohne das Anlegen eines elektrischen Feldes gewöhnlich in der Größenordnung von mehreren Stunden abläuft, wird die Dauer der Detektion erfindungsgemäß erheblich herabgesetzt, wodurch ein sehr viel kürzeres
5 Zeitfenster entsteht, welches für die Auslesung von Sensoren geeigneter ist.

Durch die oben beispielhaft erwähnte Polymeraseaktivität entstehen Pyrophosphatanionen, die bei der Polymerisation der
10 Nukleotidtriphosphate im einzelsträngigen Bereich des Hybridisierungskomplexes freigesetzt werden und zu einer lokalen Ansäuerung und damit zu einer Absenkung des pH-Wertes führen. Durch lokale Anordnung eines pH-Sensors bzw. eines pH-Detektors (z.B. pH-ISFET) kann diese Veränderung des pH-
15 Wertes, gewünschtenfalls ortsspezifisch, detektiert werden (s. Fig. 2).

Erfindungsgemäß ist ferner vorgesehen, dass die bei einer Polymerisation bzw. Ligation freigesetzten Pyrophosphationen
20 auch indirekt, d.h. über eine sekundäre Enzymkaskade detektiert werden können. An der ersten der sekundären Reaktionen sind beispielsweise ATP-Sulfurylase und Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) beteiligt. In diesem Fall wird das beim Einbau eines Nukleotids bei der Polymerisation bzw. bei einer
25 Ligation freigesetzte Pyrophosphat PPi und das APS durch die ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt. Das hierbei erzeugte ATP kann dann weitere enzymatische Reaktionen katalysieren, die der eigentlichen Detektion zugeführt werden. Zum Beispiel kann das gebildete ATP die Umsetzung von Luciferin durch die
30 Luciferase katalysieren, wodurch eine Lichtemission entsteht, welche mit den erfindungsgemäßen optischen Sensoren abgetastet werden kann.

Ein modifiziertes Beispiel für das erfindungsgemäße Verfahren betrifft die Beladung der einzusetzenden Nukleotidtriphosphate mit magnetischen Kügelchen (Baselt, a.a.O., 1998) oder mit Metallpartikel (Clinical micro sensors, a.a.O., 2000). Diese
5 Beladung hat zur Folge, dass die Auslesung noch durch zusätzliche Eigenschaften des an das Nukleotidtriphosphat gebundenen Festkörpers verstärkt wird. Des weiteren können sich Farbstoffe am Nukleotidtriphosphat befinden, die dann über eine integrierte Photodiode ausgelesen werden können.

10

Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird daher der mindestens eine Sensor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Elektrodenstrukturen, Feldeffekttransistoren, Magnetsensoren, optischen Sensoren und pH-Sensoren, um dem breiten
15 Anwendungsspektrum der vorliegenden Erfindung zu entsprechen.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform betrifft die kombinatorische Verwendung unterschiedlicher Sensoren der zuvor genannten Art. Beispielsweise könnte die
20 Signalintensität bzw. -schärfe und damit die Verlässlichkeit eines gewünschten Detektionseignisses optimiert werden, wenn eine für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Vorrichtung nicht nur einen sondenspezifischen Sensor, wie z.B. einen Feldeffekttransistor, sondern zusätzlich noch eine andere Art
25 sondenspezifischen Sensor, wie z.B. einen pH-ISFET, aufweist. Die aus dieser multiparametrischen Messung erhaltenen Daten ermöglichen gewünschtenfalls eine noch exaktere Auswertung der enzymbedingten Signale.

30 Des weiteren kann der Sensor mit einem Heizelement ausgestattet sein. Ein derartiges Element könnte beispielsweise aus Leiterbahnen bestehen, die während des CMOS-Prozesse aufgebracht und anschließend von den folgenden

Schichten abgedeckt worden sind. Hierdurch könnten Temperaturzyklen gefahren werden, was z.B. für eine PCR-gestützte Anwendung im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens gewünscht sein könnte.

5

Da eine schubweise Zugabe von Analyten bei den Sensoren sogenannte Zugabepeaks hervorrufen kann ist es vorteilhaft, wenn das erfindungsgemäße Verfahren kontinuierlich (im Durchfluss) betrieben wird.

10

Nach einem weiteren Aspekt wird eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellt.

Diese Vorrichtung umfasst mindestens eine feste Phase, mindestens eine darauf direkt oder indirekt immobilisierte Nukleinsäuresonde, sowie mindestens einen Sensor zur Erfassung der physikalischen Messdaten, wobei der Sensor integraler Bestandteil der festen Phase ist und vorzugsweise ausgewählt ist aus der zuvor definierten Gruppe bestehend aus Elektrodenstrukturen, Feldeffekttransistoren, Magnetsensoren, optischen Sensoren und pH-Sensoren.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist eine Vielzahl unterschiedlicher Nukleinsäuresonden unter Ausbildung eines Mikroarrays rasterartig angeordnet, wobei jeder immobilisierten Nukleinsäuresonde bzw. jedem spezifischen Detektionsbereich besonders bevorzugt mindestens ein Sensor zugeordnet ist.

Die aus der EP-A-0 881 490 bekannte Messeinrichtung zur Messung bestimmter physiologischer wie auch morphologischer Parameter mindestens einer zu untersuchenden lebenden Zelle kann für den erfindungsgemäßen Einsatz nach entsprechender

Modifikation verwendet werden. Die beschriebene Einrichtung weist bereits eine Vielzahl von Sensoren auf, die integraler Bestandteil einer Trägereinrichtung sind, auf welcher das zu untersuchende Material immobilisiert ist.

5

Die Trägereinheit der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht im wesentlichen aus einem Halbleitermaterial mit einer integrierten, vorzugsweise mehrere Detektoren umfassenden Detektorschicht, wobei als Detektoren mindestens einer der
10 zuvor beschriebenen Sensoren, gegebenenfalls in Kombination (s.o.), eingearbeitet ist. Ferner kann die Trägereinheit Heizelemente aufweisen, um während einer Anwendung unterschiedliche Temperaturen bereitstellen zu können (s.o.). Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die
15 Signalverarbeitung zumindest teilweise innerhalb des bzw. der eingesetzten Sensorchips.

Nach einem Aspekt der vorliegenden Erfindung können die abgetasteten Messdaten beispielsweise direkt auf dem Chip mit
20 analogen Schaltungen ausgewertet werden, indem man z.B. jede Millisekunde einen Wert aufnimmt, der dann z.B. auch mit einem Referenzwert einer zuvor durchgeführten Messung, welcher ebenfalls auf dem Chip gespeichert wurde, verglichen wird. Darüber hinaus wird auf diese Weise ermöglicht, dass man
25 unspezifische Störsignale wie z.B. eingestreute externe Signale herausrechnen kann.

Sofern die Sensoroberfläche das Design einer Microarray-Anordnung aufweist, bei der eine Vielzahl von Detektions-
30 feldern auszuwerten sind, kann die Detektion der Messfeld- bzw. -punktsignalwerte sequentiell erfolgen, indem z.B. ganze Zeilen oder Spalten der Sensoroberfläche bzw. Teile derselben nacheinander detektiert werden (Multiplexanwendung).

Beispielsweise können die elektronischen Ausgangssignale der Detektoren mittels geeigneter Schaltungseinrichtungen nach einer Analog-Digitalumsetzung einer externen Auswerteeinrichtung zugeführt werden (s.o.).

5

Um mit dieser Schicht aus Sensoren das erfindungsgemäße Verfahren durchführen zu können, kann sie nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform mit einer kopplungsfähigen Substanz beschichtet werden. Typischerweise werden hierzu die Sensor-Chip-Oberflächen, wie z.B. solche aus Siliziumdioxid, in eine Lösung von bifunktionellen Molekülen (sog. "Linker"), die beispielsweise eine Halogensilan- (z.B. Chlorsilan-) oder Alkoxysilangruppe zur Kopplung an die Trägeroberfläche aufweisen, getaucht, sodass sich eine sich selbst organisierende Monoschicht (SAM) bildet, durch welche die kovalente Bindung zwischen Sensoroberfläche und Rezeptor erzeugt wird. Beispielsweise kann mit Glycidyltriethoxysilan beschichtet werden, was z.B. durch Eintauchen in eine Lösung von 1% Silan in Toluol, langsames Herausziehen und Immobilisieren durch „Backen“ bei 120° C erfolgen kann. Eine auf diese Weise geschaffene Beschichtung weist im allgemeinen eine Dicke von wenigen Ångström aus. Die Kopplung zwischen Linker und Rezeptormoleküle(n) erfolgt über eine geeignete weitere funktionelle Gruppe, beispielsweise eine Amino- oder Epoxygruppe. Geeignete bifunktionelle Linker für die Kopplung einer Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptor-Molekülen, insbesondere auch biologischen Ursprungs, an eine Vielzahl von Trägeroberflächen sind dem Fachmann gut bekannt, vgl. beispielsweise "Bioconjugate Techniques" von G. T. Hermanson, Academic Press 1996. Hinsichtlich der Ausbildung dünner Polymerschichten als Kopplungsmatrix zur Schaffung einer funktionalisierten Oberfläche wird auf die WO 00/43539 verwiesen.

Die als Sondenmoleküle erfindungsgemäß vorgesehenen Nukleinsäuren können anschließend mittels gängiger Druckgeräte aufgebracht und immobilisiert werden.

5 Auf derart hergestellten Oberflächen können nun unter Anwendung etablierter Verfahren Hybridisierungen mit z.B. DNA durchgeführt werden. Diese kann z.B. mittels PCR erzeugt werden. Beim Hybridisieren bindet nun der DNA-Analyt an den auf dem Sensor vorhandenen Gegenstrang der Sonde (sofern
10 vorhanden). Positive Hybridisierungsereignisse können nun unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens nachgewiesen werden.

Die Messung eines ortsspezifischen Massezuwachses kann z.B.
15 durch physikalische Methoden erfolgen. Beispielsweise kann die ortsspezifische Änderung des Brechungsindex, die ortsspezifische Änderung des elektrischen Widerstandes bzw. der elektrischen Leitfähigkeit, die ortsspezifische Änderung der optischen Dichte oder auch ortsspezifische dichroische
20 Effekte, etc. gemessen werden.

Grundsätzlich ist das allgemeine erfindungsgemäße Verfahren für ein breites Spektrum an Anwendungsgebieten geeignet, wobei zwischen reinem diagnostischen Nachweis bestimmter Analyten in
25 einer zu analysierenden Probe einerseits und komplexer abgeleiteten Modifikationen des Verfahrens zur Ermittlung von Sequenzdaten oder Informationen über funktionelle Zusammenhänge im Rahmen entsprechender Genomik-Fragestellungen unterschieden werden kann. Diese Unterscheidung dient jedoch
30 nur der Veranschaulichung und soll die grundsätzlich offene Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens in keiner Weise beschränken.

Beispielsweise ist das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere geeignet zur Bestimmung von DNA-Sequenzen, die mittels paralleler Amplifikation durch verschachtelte (nested) PCR, vorzugsweise in einem kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarraysystem erzeugt wurden, da auf diese Weise sowohl auf die Verwendung modifizierter Nukleotide wie z.B. Biotin, Digoxigenin, als auch auf herkömmlich eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe und andere Markersubstanzen verzichtet werden kann. Die verschachtelte PCR im kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarraysystem (s. Fig. 4) besitzt die gleiche Empfindlichkeit wie eine konventionelle, d.h. in flüssiger Phase durchgeführte, PCR, gewährleistet aber gleichzeitig eine höhere Spezifität als herkömmliche Hybridisierungsassays und Primer-Extensionassays. Dieser Vorteil resultiert daraus, dass die dem System Primer/Proben-DNA/Polymerase eigene Spezifität in bezug auf die Amplifikation zusätzlich noch durch die spezifische Wechselwirkung zwischen dem an den festen Träger immobilisierten inneren PCR-Primer (der somit auch die Funktion einer Sonde ausübt) und dem Amplikon deutlich erhöht wird. Insgesamt resultiert so eine Spezifität, die z.B. derjenigen eines 5'-Exonuklease-Assays (z.B. unter Verwendung von TaqManTM-Polymerase) überlegen ist.

Die Signale des Sensors werden durch eine Aufnahmeeinheit aufgenommen. Eine Aufnahmeeinheit besitzt einen sehr schnellen Konverter zur Umwandlung analoger Detektorsignale in digitale Werte, die gespeichert werden. Eine Auswertung der digitalen Werte wird vorzugsweise in Echtzeit vorgenommen, kann jedoch auch zeitlich verzögert erfolgen. Zur Auswertung der digitalen Werte kann ein gewöhnlicher Mikroprozessor verwendet werden.

Die Erfindung und vorteilhafte Ausgestaltungen werden nun anhand der Figuren der Zeichnung näher erläutert:

Fig. 1 zeigt den schematischen Ablauf einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. (A) Die Nukleinsäuresonde (2) wird kovalent an die Oberfläche gebunden. (B) Nach Zugabe des Nukleinsäureanalyten (1) kommt es, gewöhnlich in einem Zeitraum von mehreren Stunden, zur Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes. (C) Durch den Einsatz eines geeigneten Enzyms, wie z.B. einer Polymerase, wird der einzelsträngige Bereich des Komplexes in Anwesenheit der vier Nukleotide A, T, G und C (im Falle von DNA) innerhalb eines sehr viel kürzeren Zeitraums von nur wenigen Minuten aufgefüllt (D), wodurch sehr viel schneller ein Signal generiert wird, welches von einem Sensor (4) als integrierter Bestandteil der festen Phase ausgelesen wird.

Die Figur 2 zeigt das Prinzip einer bevorzugten Ausführungsform unter Anwendung einer Polymerasereaktion, durch welche Pyrophosphatanionen (5) freigesetzt werden, die zu einer lokalen Veränderung des pH-Wertes führen. Diese Veränderung kann vom integrierten Sensor (4) erfasst werden.

Die Figur 3 zeigt einen im Rahmen eines CMOS-Prozesses hergestellten Feldeffekttransistor. Der Feldeffekttransistor besteht z.B. aus einer p-n-p Schicht (6) in einer n-Wanne mit einem dünnen Isolator (10) (z.B. 10 nm thermisches Oxid), der sich an der Oberfläche befindet und auf den direkt oder indirekt die Nukleinsäuresonde aufgebracht wird, die dann die Hybridisierung eingeht. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Kratzschutz (7) im Bereich des Feldeffekttransistors entweder scharfkantig oder stufenweise heruntergeätzt, sodass der Vorgang der Hybridisierung und des Massenzuwachses (8) in

einem vertieften Bereich stattfindet. Die Oberflächen der Vorrichtung können durch Aufbringung von z.B. Edelmetall oder hydro-phoben/hydrophilen Materialien (9) die Hybridisierung der Nukleinsäuremoleküle aktiv oder passiv beeinflussen. In einer Messlösung (11), wie z.B. 1 M NaHCO_3 , erfolgt die Messung der Veränderung der dielektrischen Eigenschaften auf dem Gate, die durch das Auffüllen des einzelsträngigen Bereichs des Hybridisierungskomplexes stattfinden. Die hierdurch bewirkte Verschiebung des Flachbandpotentials kann mit dem Feldeffektransistor unter Verwendung einer sich in der Lösung befindlichen Referenzelektrode (12) ausgelesen werden. Als Signal können z.B. der Strom zwischen Drain und Source oder die Spannung zwischen Referenzelektrode und Source aufgenommen werden (s. z.B. B. Palan et al., Fundamental Noise Limits of ISFET-Based Microsystems, Poster-Beitrag 4P26, EUROSENSORS XIII (ISBN 90-76699-02-X), S. 169 ff., 1999).

Die Figur 4 zeigt die im Verlauf einer parallelen Amplifikation auf der Basis einer sogenannten „Nested On Chip“ PCR (NOC, s.o.) mit einem FET abgetastete Spannungsveränderung. In A ist die Spannungsänderung an einer Sondenposition über den Verlauf einer ganzen NOC dargestellt. Die X-Achse gibt die Anzahl der Zyklen an, während auf der Y-Achse die gemessenen Spannung angegeben ist. Unterhalb der X-Achse sind die an die Sondenposition gekoppelten Primermoleküle (=Sondenmoleküle) symbolisiert: In den ersten Zyklen sind nur wenige Primer elongiert, gefolgt von einer starken exponentiellen Zunahme in den mittleren Zyklen und einer zunehmenden Sättigung (weitgehend alle Primer elongiert) in den späten Zyklen. Die Kurve zeigt, wie mit Zunahme der Masse an der Sondenposition die gemessene Spannung ansteigt. In B ist der Spannungsverlauf eines einzigen Zyklus (mittlerer Zyklenzahl) dargestellt. Zusätzlich zum Primer sind hier auch

das Template und von links nach rechts die Elongation eines Primers dargestellt. Aus der Darstellung ist ersichtlich, dass die Spannung in Abhängigkeit von der Primerverlängerung ansteigt.

5

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele näher erläutert.

Herstellung eines erfindungsgemäßen Sensorchips

10 Der CMOS-Sensor wird auf 5 oder 6'' Wafern mit einem 1,2 µm CMOS-Prozess gefertigt. Jeder Feldeffektransistor befindet sich in einer n-Wanne auf p-Substrat. Nach der Feldoxidation folgt die Implantation der Drain- und Source Regionen. Das thermische Gateoxid mit einer Dicke von ca. 10 nm wird
15 aufgebracht. Das Gate wird durch Polysilizium während der folgenden Prozessschritte geschützt. Dann wird ein Silizium-Dioxid-Layer mit Hilfe eines CVD-Prozesses aufgebracht und strukturiert. Aluminium wird aufgesputtert und ebenfalls strukturiert. Eine Passivierung wird durch einen Si₃N₄-PECVD-
20 Nitrid und einen CVD-SiO₂-Layer erreicht. Bei den nächsten Ätzschritten wird der Gateisolator freigelegt.

Beschichtung des CMOS-Sensors

Der wie oben hergestellte CMOS-Sensor wird durch Tauchen in
25 eine Lösung von 1% GOPS (Glycidoxypropyltriethoxysilan) und 0,1% Triethylamin in Toluol für eine Zeitdauer von ca. 2 Stunden mit dem Silan beschichtet. Anschließend wird der Chip aus der Lösung entnommen und nach kurzem Abtropfen bei 120° C für eine Zeitdauer von etwa 2 Stunden im Trockenschrank
30 fixiert.

Gewünschtenfalls kann der so beschichtete Chip bis zur Biokonjugation unter Feuchtigkeitsausschluß gelagert werden.

Biokonjugation mit Oligonukleotidsonden

Unter Anwendung herkömmlicher Techniken wird der wie oben beschichtete Chip mit 5'-aminomodifizierten Oligonukleotidsonden kontaktlos bedruckt. Die Oligonukleotidsonden werden hierfür in einer Konzentration von 5 µM in PBS-Puffer gelöst bereitgestellt. Nach dem Bedrucken wird die Kopplungsreaktion bei 50°C in einer feuchten Kammer fortgesetzt. Anschließend werden die Chips mit destilliertem Wasser gespült und sodann zum Trocknen mit Methanol gewaschen. Etwaige verbleibende Lösungsmittelreste werden abschließend durch Verdunsten unter dem Abzug entfernt.

Probengewinnung

Aus humanen DNA-Isolaten werden mittels PCR Fragmente des Haemochromatosegens amplifiziert. Bei der Amplifikation werden geeignete Primersequenzen verwendet, wie sie z.B. im US-Patent 5,712,098 beschrieben sind.

Im Reaktionsmix befinden sich folgende Standardreagenzien (Primer: 0,5 µM, dATP, dCTP, dGTP: 0,1mM, dTTP 0,08 mM, PCR-Puffer, MgCl₂: 4mM, HotStarTaq (Perkin Elmer) 2 Einheiten (50 µl). Bei der PCR-Reaktion (35 Zyklen, 5 min 95°C, 30 sek 95°C, 30 sek 60°C, 30 sek 72°C, 7 min 72°C) werden die vorhandenen Nukleotide in die neu zu synthetisierende DNA eingebaut. Anschließend wird durch Zugabe von T7 Gen6-Exonuklease (100 Einheiten/ 50 µl PCR-Ansatz) und Erhitzen des Ansatzes (30 min 37°, 10 min 85°) Einzelstrang-DNA generiert.

Hybridisierung

Der obige Reaktionsansatz wird in einem Puffer 5 x SSPE, 0,1% SDS (12 µl) unter einem Deckgläschen für eine Zeitdauer von 2 Stunden bei 50° C in der feuchten Kammer auf dem Chip

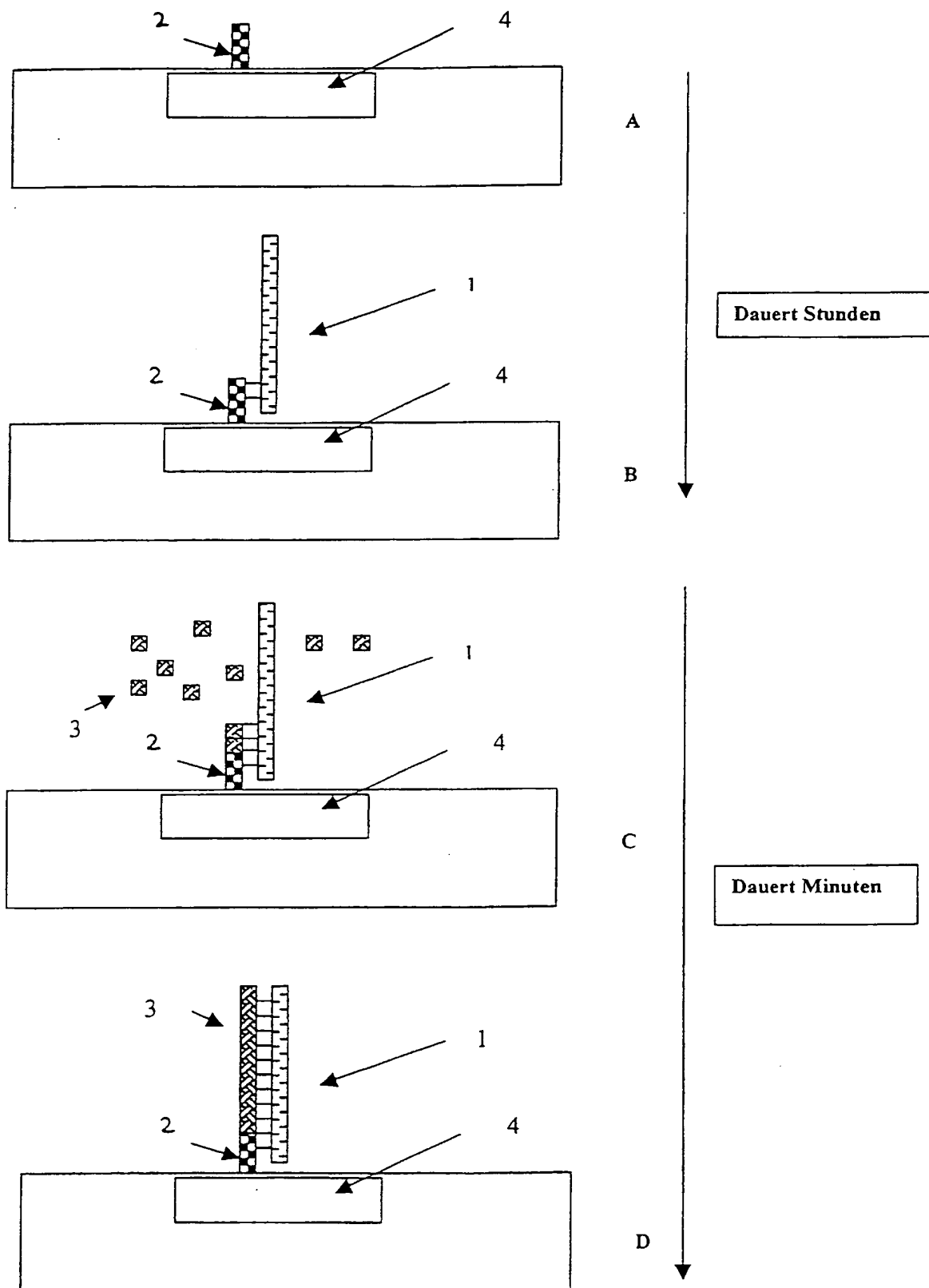
hybridisiert. Anschließend wird mit 2 x SSPE 0,1% SDS gespült und der Chip durch Waschen in Wasser gereinigt.

Patentansprüche

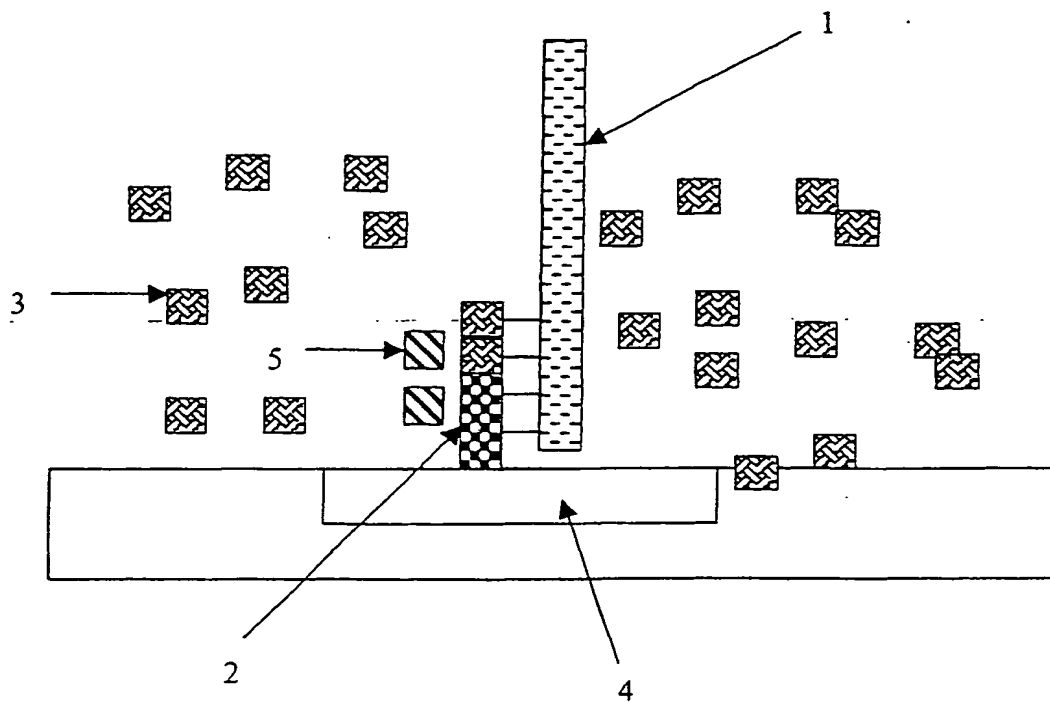
1. Verfahren zur Bestimmung eines Nukleinsäureanalyten durch Hybridisierung des Analyten an eine geeignete, auf einer festen Phase immobilisierte Nukleinsäuresonde, bei dem man
 - (a) den Nukleinsäureanalyten zur Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen mit der Nukleinsäuresonde inkubiert, und
 - (b) den Analyten bestimmt auf der Basis chemisch/physikalischer Messdaten, die spezifisch mit einer enzymbedingten Massenzu- oder abnahme des Hybridisierungskomplexes im Zusammenhang stehen,wobei die Messung der Daten durch mindestens einen Sensor erfolgt, welcher integraler Bestandteil der festen Phase ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Schritte (a) und (b) kontinuierlich (im Durchfluss) erfolgen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem das die Massenzu- oder abnahme des Hybridisierungskomplexes bewirkende Enzym aus der Gruppe bestehend aus Polymerasen, Ligasen, Ribozymen, quasi-katalytischen Nukleinsäuren, DNasen/RNasen, und RNase H, ausgewählt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem als Enzym eine Polymerase ausgewählt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die Polymerase eine 5'- und/oder 3'-Exonukleaseaktivität aufweist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der mindestens eine Sensor ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Elektrodenstrukturen, Feldeffekttransistoren, Magnetsensoren, optischen Sensoren, pH-Sensoren, und Kombinationen derselben.
7. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend mindestens eine feste Phase, mindestens eine darauf direkt oder indirekt immobilisierte Nukleinsäuresonde, sowie mindestens einen Sensor zur Erfassung der chemisch/physikalischen Messdaten, wobei der Sensor integraler Bestandteil der festen Phase ist.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, bei der der mindestens eine Sensor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Elektrodenstrukturen, Feldeffekttransistoren, Magnetsensoren, optischen Sensoren, pH-Sensoren, und Kombinationen derselben.
9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, bei der eine Vielzahl unterschiedlicher Nukleinsäuresonden unter Ausbildung eines Mikroarrays rasterartig angeordnet ist.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, bei der jeder immobilisierten Nukleinsäuresonde mindestens ein Sensor zugeordnet ist.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, welche zusätzlich mindestens ein Heizelement umfasst, das dem mindestens einen Sensor zugeordnet ist.

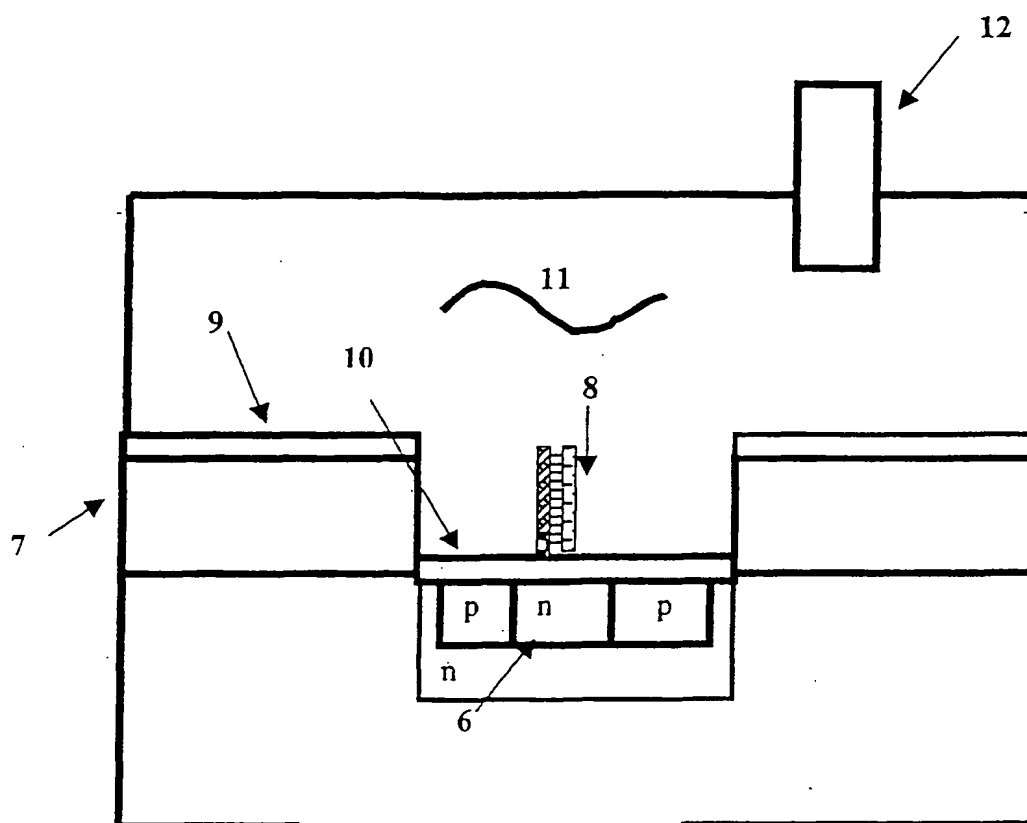
Figur 1



Figur 2



Figur. 3



Figur 4

